

ウシ発育途上卵子の体外発育及び凍結保存に関する研究

著者	伊藤 丈洋
号	668
発行年	2003
URL	http://hdl.handle.net/10097/16982

氏 名(本籍) い伊 とう藤 たけ丈 ひろ洋

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 6 6 8 号

学位授与年月日 平 成 15 年 11 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ウシ発育途上卵子の体外発育及び凍結保存に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 佐 藤 英 明
(副 査) 教 授 山 口 高 弘
教 授 西 森 克 彦

論文内容要旨

緒言

哺乳動物の卵巣内には多数の発育途上卵子の存在が知られている。しかし、これらの大多数は発育途上で退行してしまう運命にある。もし、これらの発育途上卵子を効率的に卵巣から単離し、体外培養によって完全発育が可能となれば、卵胞や卵子の発育メカニズムの解明という基礎的な知見を得るために多大な役割を果たすことはもちろんのこと、家畜繁殖技術、絶滅種の保護・再生、ひいては不妊治療等、応用面においても重要な技術となりうると考えられる。また、これらの発育途上卵子の凍結保存技術が確立されれば、貴重な遺伝子資源としての卵子の長期間にわたる保存や遠距離輸送などが可能となる。これら発育途上卵子の体外培養技術と凍結保存技術を連携することにより、それぞれの技術は極めて有用性の高い技術となりうると考えられ、畜産分野に多大な貢献をもたらすものと考えられる。

発育途上卵子は卵胞を構成する細胞群と相互作用しながら発育し、その発育の程度に応じて、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、三次卵胞、グラーフ卵胞等に分類される。これまでに、マウスの発育途上卵子を用いた研究では、原始卵胞由来の発育途上卵子を体外発育させ、体外受精、胚移植を経て産子を得ることに成功した例が報告されている。一方、家畜由来の発育途上卵子の体外発育においては、ブタ、ヒツジにおいて後期二次卵胞由来の発育途上卵子を体外培養によって発育させ、それぞれ受精可能な卵子であることや減数分裂再開能を有する卵子であることを示した例がある。しかし、ウシにおいては発育した後期三次卵胞由来の超未成熟卵子を発育させ、体外受精により胚盤胞を得て、胚移植を経て一頭の産子を得ることに成功した例が報告されているのみである。家畜、とりわけウシにおいては、卵子の完全発育には3ヶ月以上必要とされ、マウスなど他の種の成功例における技術をそのまま適用しても、より未発育な段階の卵子から体外培養によって完全発育卵子を得ることは困難である。

本研究においては、ウシの発育途上卵子の発育ステージを初期前胞状卵胞（一次卵胞～初期二次卵胞）、中期前胞状卵胞（後期二次卵胞）、後期前胞状卵胞（後期二次卵胞～初期三次卵胞）の3つに分類し、それぞれのステージにおいて発育に必要な環境及び因子の探索を行い、最良の卵胞・卵子発育培養環境を構築することを目的とした。さらに、これらを連携することにより、より未発育な段階の発育途上卵子から発生能を有する完全発育卵子を得ることを目指した。

発育途上卵子の凍結保存においては、体外培養系と同様に発育ステージごとに最適な凍結保存方法を検討した。さらに、凍結保存した発育途上卵子においても体外発育培養系で正常な発育が行われることを検証した。

第1章 ウシ初期前胞状卵胞の体外発育培養

初期前胞状卵胞(卵胞直径 100 μm 以下)の体外発育培養においては、卵胞構成細胞の生存性およびそれらの正常な相互作用を長期間にわたって維持することが強く求められる。そこで、初期前胞状卵胞を卵巣から、低侵襲で効率的に単離する方法について検討した。さらに、単離した初期前胞状卵胞を種々の体細胞と共培養することにより、生存性を維持しながら中期前胞状卵胞への無血清培地による体外発育の可能性について検討した。

ウシ卵巣から初期前胞状卵胞を採取する方法として、卵巣表層組織を機械的に挫滅分散する方法とコラゲナーゼを用いて組織を消化分散する方法でそれぞれ初期前胞状卵胞を単離し、組織学的に評価を行った。機械的単離法で回収した卵胞では、顆粒膜細胞間の接着が密であり、顆粒膜細胞の外側には、基底膜が認められ、その外側には、コラーゲン繊維構造の発達した比較的厚い層が形成されていた(Fig.1A,C)。一方、酵素法で単離した卵胞では、顆粒膜細胞の外側には基底膜は認められず、顆粒膜細胞間の接着はあまりみられず、広い細胞間隙には多数のコラーゲン層の断片化が観察された(Fig.1B,D)。以上の結果から、初期前胞状卵胞を低侵襲で効率的に単離する方法として機械的単離法が優れていることが判明した。

機械的に単離した初期前胞状卵胞をウシ卵巣間質組織由来細胞(BOM)、ウシ胎子皮膚由来線維芽細胞(FBF)、ウシ顆粒膜細胞(BCG)、及びウシ卵管上皮細胞(BOEC)と共培養し、卵胞の生存性を評価した(Table1)。コントロールの非共培養区では14日後には生存卵胞は観察できなかった。他方、BOM並びにFBFと共培養して卵胞を培養したところ、コントロールに対して有意に正常卵胞率及び生存卵胞率が高く、培養30日後でもBOMで18.6%、FBFで17.1%の卵胞が生存していた。BCG細胞では30日間培養で10%の卵胞生存率であり、BOEC細胞では、30日目には生存卵胞は存在しなかった。卵胞生存活性はBOMならびにFBFの培養上清には認められなかったことから、初期前胞状卵胞の生存維持活性は間質系細胞との直接的な相互作用によるものと考えられた。次に間質系細胞との共培養による初期前胞状卵胞の体外発育について検討した。コントロールでは継時的に卵胞形態の変化が著しく、正常形態を維持していた卵胞の中で培養14日目にやや卵胞径の増加が認められたものの、28日間培養では正常形態卵胞は存在していなかった。一方、FBF共培養区では、平均直径は67.4 μm から培養28日目には111.9 μm に達し、中期前胞状卵胞への発育が認められた。

第2章 ウシ初期前胞状卵胞の凍結保存

初期前胞状卵胞の凍結保存においては、融解後において高い生存性と、高い回収率が求められる。予備的な実験から、初期前胞状卵胞は低温処理に対して高い

感受性を示し、生存性が著しく失われること、さらに、凍結器材への吸着等により、融解後の回収率が著しく損なわれることが示された。そこで、初期前胞状卵胞を細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲンゲルに包埋した状態でガラス化保存することにより、生存性の低下を抑え、高い回収率を得ることを検討した。卵胞のガラス化保存容器として、胚の凍結保存に用いられている凍結ストローや凍結バイアルを用いると、ほとんどの卵胞が容器に吸着し、回収率は著しく低下した。しかし、卵胞をコラーゲンゲルに包埋してから凍結バイアルに入れることで、容器への吸着が防止でき、高い回収率が得られた。コラーゲンゲルの体積、ガラス化液の濃度や処理時間の最適化を図り、コラーゲンゲルに卵胞を包埋してガラス化急速冷却凍結保存すると、凍結しない未凍結卵胞の回収率や生存率よりは低い、比較的高い回収率及び生存率が得られた。

ガラス化保存・融解後のコラーゲンゲル包埋した初期前胞状卵胞を体外培養して生存卵胞が得られるかどうか調べた。さらに、体外培養することによって卵胞構成細胞の増殖が惹起されることを確認するために BrdU の取り込みによる DNA 合成細胞の検出を行った。未凍結卵胞の生存率 (36.4%) に対して、ガラス化保存した卵胞の生存率は、18.4%であった (Table3)。また、体外培養において未凍結卵胞 (Fig.2A,B)と同様にガラス化保存卵胞 (Fig.2C,D)についても DNA 合成細胞が認められた。BrdU 陽性卵胞の割合は、未凍結卵胞で 36.7%、ガラス化保存卵胞で 14.3%となり、生存卵胞の割合とほぼ同じ値となった (Table4)。また、DNA 合成細胞の割合を見ると、未凍結卵胞で 20.9%、ガラス化保存卵胞では 23.6%となり、ガラス化保存した卵胞も未凍結卵胞と同様に体外培養で発育可能であることが示された。

第3章 ウシ中期前胞状卵胞の体外発育培養

中期前胞状卵胞 (卵胞直径 200 μ m 以下) においては、種々の生理活性因子等への反応性が高まり、卵胞構成細胞の機能分化が進む段階であると考えられる。そこで、卵胞の3次元構造の維持が可能な培養形態を選択し、無血清培養系を用いて卵胞・卵子の発育に影響を与える生理活性物質の探索を行った。また、適切な生理活性物質の存在下において、後期前胞状卵胞への体外発育について検討した。

卵巢表層組織から微細切的に単離した卵胞をコラーゲンゲルに包埋して 13 日間培養し、無血清培地に種々の生理活性物質 (インスリン、インスリン様成長因子、ゴナドトロピンなど) を添加し、卵胞直径の経時的变化及び培養終了時の卵子直径を調べた。また、卵胞構成細胞の機能分化の指標として、卵胞腔形成及び培養液中へのエストラジオール 17 β (E_2) 分泌をそれぞれ形態的及び酵素免疫法を用いて経時的に測定した。

生理的濃度のインスリン、IGF-I に強い卵胞及び卵子直径の増大作用が認められた。IGF-II、FSH、LH にも弱い卵子直径増大作用が認められた。インスリン、FSH、LH 同時添加によって、インスリン単独添加に対して有意な卵子直径増大が観察されたが (Fig.3A)、IGF-I においては FSH、LH による増強作用は観察されなかった (Fig.3B)。卵胞腔形成においては、それぞれインスリン、IGF-I、FSH 単独添加区において促進作用が観察され、培養終了時においてインスリン及び IGF-I 添加区では卵胞腔形成率は約 60%に達した。E₂ 産生については、インスリンにのみ分泌促進作用が観察され、他の因子には促進作用は観察されなかった。さらに、インスリン、FSH、LH 同時添加により、卵胞腔形成、E₂ 産生ともにインスリン単独添加に比べて早期に誘導され、E₂ 産生は培養 5 日目以降有意に産生が増加した (Fig.4)。次に中期前胞状卵胞の培養前後の形態について観察を行った。単離した卵胞 (Fig.5a,c) は、顆粒膜細胞が密に存在し、卵胞腔の形成は観察されなかった。一方、インスリン、FSH、LH 添加無血清培地で 13 日間体外培養した卵胞は、卵胞及び卵子直径の増大、卵胞腔の形成、顆粒膜細胞や莢膜細胞の著しい増殖などが確認され、後期前胞状卵胞への発育も確認された (Fig.5b,d)。以上の結果から、インスリンは中期前胞状卵胞の発育及び機能分化に重要な因子であり、FSH、LH はその作用を増強する作用を示すことが明らかにされた。

第 4 章 ウシ後期前胞状卵胞の体外発育培養と体外発生培養

後期前胞状卵胞 (卵胞直径 300 μ m 以下) においては、中期前胞状卵胞より発育や機能分化が進み、一部では卵胞腔の形成も観察される。第 3 章で検討した中期前胞状卵胞と同様に、卵巢表層から微細切的に単離した後期前胞状卵胞をコラーゲンゲルに包埋して 3 次元構造維持しながら無血清培地を用いて培養し、卵胞・卵子直径の変化や機能分化に影響を与える生理活性物質の探索を行った。さらに、後期前胞状卵胞由来卵子の完全発育を遂行する目的で卵胞培養後に卵子-卵丘-顆粒膜細胞複合体 (COCGs) を摘出し、血清含有培地で発育培養を行うことにより、完全発育卵子を得ることを検討した。この二段階培養により完全発育した後期前胞状卵胞由来卵子について、体外成熟培養、媒精、発生培養を行い、その発生能について検討を行った。

生理的濃度のインスリン、IGF-I、FSH に卵胞直径増大作用が観察された。インスリンと FSH の同時添加においては、相加的な卵胞直径増大作用が観察された。一方で、IGF-I に FSH を添加した場合には相加的作用は認められなかった (Fig.6A)。培養後における卵子直径はすべての生理活性因子添加区においてコントロールに比べて有意に増大が認められた (Fig.6B)。E₂ 産生に及ぼす効果を検討したところ、インスリン添加区において著しい E₂ 産生が認められ、FSH 添加によっても弱い産生

が認められた。インスリンと FSH を同時に添加することで、インスリン単独添加に比べて、 E_2 産生の時期が早まると同時に相加的な E_2 産生作用が認められた。一方、IGF-I と FSH の同時添加では、 E_2 分泌は誘導されなかった。インスリンと IGF-I は互いのレセプターに対して弱い親和性を有している。単離した後期前胞状卵胞及び培養後の胞状卵胞におけるインスリンレセプターファミリーの遺伝子発現を RT-PCR 法で調べると IGF-I 及びインスリンレセプター遺伝子の発現は培養前後の後期前胞状卵胞 (Fig.7A) で観察された。インスリンの活性が IGF-I レセプターを介したものではないことを確認するために、IGF-I レセプターを中和抗体処理によってその結合能を阻害したときの効果について検討したところ IGF-I レセプター中和抗体処理によって、IGF-I 添加区における卵胞直径増大は完全に抑制されたのに対して、インスリンの卵胞径増大効果に対する抑制作用は認められず、インスリンの作用は IGF-I レセプターを介したものではないことが明らかとなった (Fig.7B)。Fig.8 は、培養前後の後期前胞状卵胞の形態観察像を示す。インスリン、FSH 存在下で培養した卵胞では、卵胞腔形成、卵胞及び卵子サイズの成長、顆粒膜細胞の増殖、莢膜細胞の増殖による多層化などが観察された。

後期前胞状卵胞を無血清基礎培地にインスリン、FSH を同時添加して 7 日間培養し、更に COCGs として 14 日間培養を行うことより卵子の完全発育を目指した (Fig.9)。COCGs 培養を行うことにより、インスリン、FSH 添加卵胞培養群由来の卵子においては有意な卵子直径成長が観察されたが、無血清基礎培地卵胞培養群由来 COCGs では正常形態を有しているものは認められなかった (Fig.10)。21 日間におよぶ二段階培養により卵子の平均直径は $105.3 \mu\text{m}$ にまで成長した。二段階培養によって成長した卵子について体外成熟、体外受精及び体外胚培養を行った。その結果、供試後期前胞状卵胞の 8.1% が 2 細胞期胚、さらに 0.6% が胚盤胞期胚へと発生した。Fig.11 は後期前胞状卵胞由来卵子より作製した胚盤胞期胚である。

第 5 章 ウン中期及び後期前胞状卵胞の凍結保存

中期及び後期前胞状卵胞の凍結保存については、融解後の卵胞及び卵子の発育が未凍結のものと同等であることが求められる。そこで、ガラス化法を用いて保存し、融解後に第 3 章、及び第 4 章において構築された体外培養系を用いて、卵胞・卵子発育について検討した。

中期前胞状卵胞について、ストロー封入した後にガラス化保存を行い、融解した後に体外培養を行った。無血清培地にインスリン、FSH、LH を添加して体外培養したところ、凍結保存卵胞は新鮮卵胞とほぼ同様な卵胞径の増加が見られ、13 日後には約 $300 \mu\text{m}$ にまで達した (Fig.12A)。同様に、培養 13 日後の卵子直径についても未凍結卵胞の平均 $72.5 \mu\text{m}$ に対して、ガラス化保存卵胞でも平均 $70.8 \mu\text{m}$ にまで

成長し、基本培地のみで培養した未凍結卵胞の $56.5\mu\text{m}$ に比べて有意に卵子直径の増大が認められた(Fig.12B)。凍結保存した卵胞の E_2 産生について調べたところ、未凍結卵胞と同様にインスリンによる産生促進作用が観察された。さらに、FSH と LH 添加による増強作用も観察され、培養 13 日後には未凍結卵胞とほぼ同じ産生量に達した(Fig.13)。ガラス化保存した後期前胞状卵胞を無血清基本培地にインスリン、FSH を添加して体外培養したところ、ガラス化保存卵胞は未凍結卵胞に比べて卵胞直径増大の遅れが認められたものの、9 日後においても成長の継続が観察された。卵子直径についても未凍結卵胞の平均 $80.5\mu\text{m}$ に対して、ガラス化保存卵胞では平均 $77.5\mu\text{m}$ にまで増大し、基本培地のみで培養した未凍結卵胞の平均 $58.5\mu\text{m}$ に比べて有意な増大が観察された。ガラス化保存した卵胞の E_2 産生について調べたところ、未凍結卵胞と同様にインスリンによる産生促進作用が観察され、さらに、FSH 添加による相加作用も観察された。

総 括

1. 単離したウシ初期前胞状卵胞の体外培養において、間質系細胞と共培養することにより、長期間生存を維持した状態で発育させることに成功した。また、この生存維持作用は、細胞との細胞外マトリックスタンパク質を介したものであることが示唆された。
2. 単離したウシ初期前胞状卵胞の凍結保存において、コラーゲンゲル包埋した状態で、ガラス化保存を行うことにより、融解後において高い回収率と生存率を可能とした。また、融解後の卵胞は発育能を有することも明らかにされた。
3. 生理的濃度のインスリンは単離中期前胞状卵胞の卵胞・卵子直径増大、機能分化を促進することが、無血清培養系により明らかにされた。さらに、FSH、LH はインスリンの作用を増強することも示された。これらの因子の存在下で培養された後期前胞状卵胞は形態的に正常に発育することも明らかにされた。
4. 生理的濃度のインスリン、FSH は後期前胞状卵胞の正常な発育に重要な因子であることが、明らかにされた。また、二段階の培養により完全発育した後期前胞状卵胞由来卵子は発生能を有していることが確認され、世界で初めて胚盤胞期胚にまで発生させることに成功した。
5. ガラス化保存された中期及び後期前胞状卵胞は、融解後の発育培養において正常な発育能を有することが明らかにされた。

原著論文

1. Takehiro ITOH, Yuji HIRAO, Masayuki KACCHI, Hiroyuki ABE and Hiroyoshi HOSHI. Complete growth and development of oocytes derived from bovine growth phase oocytes by a two- step culture system. *Biology of Reproduction*, 2003 (投稿準備中)
2. Takehiro ITOH, Masayuki KACCHI, Hiroyuki ABE and Hiroyoshi HOSHI. High recovery from successful cryopreservation of bovine small preantral follicles embedded within collagen gels. *Tissue Culture Research Communications*, 2002, 21, 109-119.
3. Takehiro ITOH, Masayuki KACCHI, Hiroyuki ABE, Yutaka SENDAI and Hiroyoshi HOSHI. Growth, antrum formation and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biology of Reproduction*, 2002, 67, 1099-1105.
4. Takehiro ITOH and Hiroyoshi HOSHI. Efficient isolation and long-term viability of bovine small preantral follicles in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 2000, 36, 235-240.

参考論文

1. Yuji HIRAO, Takehiro ITOH, Manabu SHIMIZU, Kosuke IGA, Kazushige AOYAGI, Masato KOBAYASHI, Hiroyoshi HOSHI, Naoki TAKENOUCHI. In vitro growth and development of growing bovine oocytes on the flat substratum: effects of a high concentration of polyvinylpyrrolidone in the culture medium. *Biology of Reproduction*, 2003 (投稿中)
2. Yutaka SENDAI, Takehiro ITOH, Shoko YAMASHITA and Hiroyoshi HOSHI. Molecular cloning of a cDNA encoding a bovine growth differentiation factor-9 (GDF-9) and expression of GDF-9 in bovine ovarian oocytes and in vitro produced embryos. *Cloning*, 2001, 3, 3-10.
3. 伊藤丈洋. 卵子および卵胞の培養と応用 動物細胞工学ハンドブック, 日本動物細胞工学会編, 朝倉書店, 2000 年, 264-265.
4. 伊藤丈洋, 星 宏良. 前胞状卵胞・卵子の体外発育培養法 卵子研究法, 鈴木秋悦, 佐藤英明編, 養賢堂, 2001 年, 119-124.
5. Shoko YAMASHITA, Hiroyuki ABE, Takehiro ITOH, Takeshi SATOH and Hiroyoshi HOSHI. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology*, 1999, 31: 1-9.

6. Hiroyuki ABE, Shoko YAMASHITA, Takehiro ITOH, Takeshi SATOH and Hiroyoshi HOSHI. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, 1999, 53, 325-335.
7. Takehiro ITOH, Hiroyuki ABE, Shoko YAMASHITA, Yutaka SENDAI, Takeshi SATOH, Hiroyoshi HOSHI. Bovine mesenchymal-derived cells support long-term survival and growth of bovine preantral follicles in vitro. *Theriogenology*, 1999, 51, 302.
8. Hiroyuki ABE, Shoko YAMASHITA, Takehiro ITOH, Takeshi SATOH, Hiroyoshi HOSHI. Histochemical and ultrastructural evaluations of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing media. *Theriogenology*, 1999, 51, 232.
9. Tadanori TANAHASHI, Takehiro ITOH, Masashi SUZUKI and Toru IMAMURA. Reconstitution of FGF-1 mitogenicity for rat hepatocytes with dialyzed fetal bovine serum and stabilized-ascorbic acid. *Tissue Culture Research Communications*, 1997, 16, 195-199.
10. 伊藤文洋, 星 宏良. ウシ胚培養 動物生産生命工学, 村松達夫編, 文永堂出版, 1996 年, 117-125.
11. Masashi SUZUKI, Takehiro ITOH, Hiroyuki OSADA, Rubin JS, Aaronson SA, Toru SUZUKI, Nobimitsu KOGA, Takao SAITO and Youji MITSUI. Spleen-derived growth factor, SDGF-3, is identified as keratinocyte growth factor (KGF). *FEBS Letters*, 1993, 328, 17-20.
12. Takehiro ITOH, Masashi SUZUKI, Youji MITSUI. Keratinocyte growth factor as a mitogen for primary culture of rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 192, 1011-1015.
13. Masashi SUZUKI, Takehiro ITOH, Toru SUZUKI, Nobimitsu KOGA, Katsuya KATO, Takao SAITO, Youji Mitsui. Identification of the hepatocytes mitogen in bovine spleen as heparin-binding growth factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992, 186, 1192-1200.
14. Masayuki TANIGUCHI, Kazuhiro HOSHINO, Takehiro ITOH, Hiroshi KUMAKURA, Michihiro FUJII. Production of superoxide dismutase in *Streptococcus lactis* by a combination of use of hyperbaric oxygen and fermentation with cross-flow filtration. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39, 886-890.

15. Masayuki TANIGUCHI, Isao NAKAGAWA, Kazuhiro HOSHINO, Takehiro ITOH, Kohei OHNO and Michihiro FUJII. Production of superoxide dismutase from *Streptococcus lactis* using a bioreactor with a microfiltration module. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1989, 53: 2447-2453.

受賞

1. 平成 14 年度日本組織培養学会奨励賞受賞
(平成 14 年 5 月)
2. 第一回山形県科学技術奨励賞受賞
(平成 14 年 8 月)

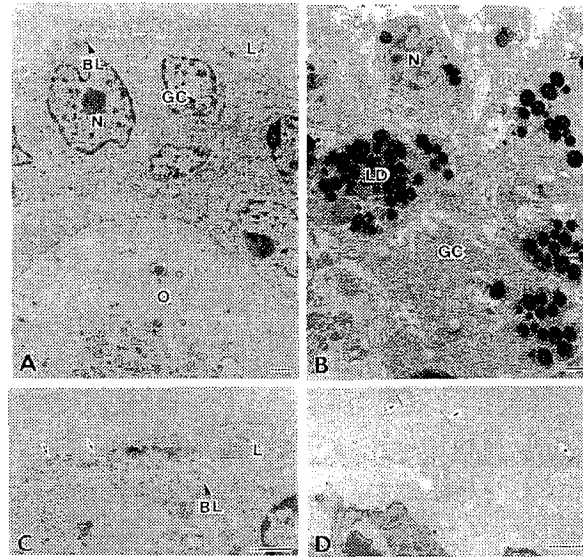


Fig.1 Electron microscopic observation of early stage preantral follicles isolated by mechanical (A, C) or enzymatic (B, D) method. BL: basement membrane, GC: granulosa cell, L: basal lamina, LD: lipid droplet, N: nucleus, O: oocyte. Arrowhead: collagen fiber. Scale bar=1 μ m.

Table 1. Numbers and percentages of viable early stage preantral follicles in co-cultured with BOM, FBF, BGC and BOEC for 7, 14, and 30 days.

Culture conditions	No. and percentage of VF/ total follicles ^a			
	0 (days)	7 (days)	14 (days)	30 (days)
Control	30/49 (61.2)	20/85 (23.5)	5/77 (6.5) ^b	0/26 (0.0) ^b
BOM	-	17/45 (38.0)	12/41 (29.3) ^c	8/43 (18.6) ^c
FBF	-	16/49 (32.3)	9/31 (29.0) ^c	6/35 (17.1) ^c
BGC	-	13/39 (33.3)	9/32 (28.1) ^c	3/30 (10.0) ^{bc}
BOEC	-	12/40 (30.0)	7/40 (17.5) ^{bc}	ND

^a Data are collected from four replicate wells of two different experiments. b-c Values with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.01).

Table 2. In vitro growth of early stage preantral foilicles co-cultured with somatic feeder cells.

Culture conditions	No. of follicles	Follicular diameter(μ m \pm SEM)		
		Day 7	Day 14	Day 28
Control ¹⁾	65	65.2 \pm 1.8 (65)	75.2 \pm 5.2 (6)	-
FBF-coculture	54	67.4 \pm 2.1 (54)	85.6 \pm 3.4 (31)	111.9 \pm 7.3 (26)

1) Type I collagen treated dish. Nos. in parenthesis represents the number of follicles with normal morphology.

Table 3. In vitro survival of collagen gel-embedded early stage preantral follicles after equilibration, cryopreservation and thawing.

Treatment	No. of follicles	No.(%) of ¹⁾ recovered follicles	No.(%) of ²⁾ viable follicles
Untreated preantral follicles	60	55(91.7) ^a	20(36.4) ^a
Vitrified preantral follicles	80	38(47.5) ^b	7(18.4) ^b

a, b Values with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). 1) Recovery (%) = (No. of recovered follicles / No. of follicles) X 100. 2). Viability (%) = (No. of viable follicles / No. of follicles) X 100.

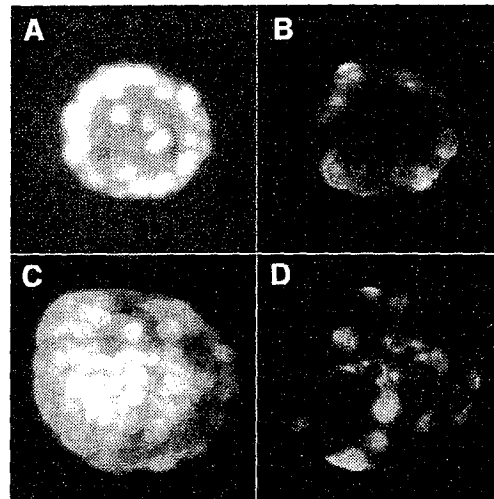


Fig.2. Hoechst 33258-staining (A, C) and BrdU-labeling (B, D) of cell nuclei in non-vitrified (A, B) and vitrified early stage preantral follicles (C, D) after 7 days in culture.

Table 4. Proliferating cell index of collagen gel-embedded early stage preantral follicles with or without vitrification after 7 days in culture.

Treatment	No. of follicles	No. (%) of BrdU-incorporated follicles	Mean proliferating cell ¹⁾ index (Mean % \pm SEM)
Untreated preantral follicles	30	11(36.7)	20.9 \pm 3.5
Vitrified preantral follicles	14	2(14.3)	23.6

1) Proliferating cell index (%) = (No. of BrdU-incorporated cell nuclei / No. of total cell nuclei).

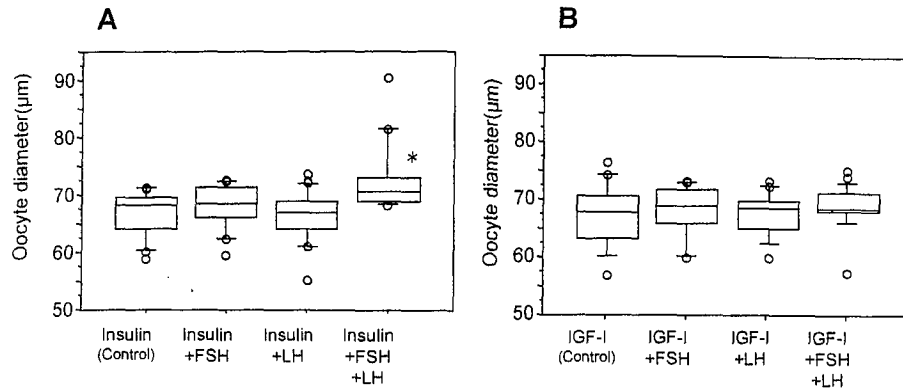


Fig. 3. Combination effects of FSH and LH with insulin (A) or IGF-I (B) on oocyte growth of middle stage preantral follicles during 9 days in culture. * Significantly to the control value ($P < 0.05$).

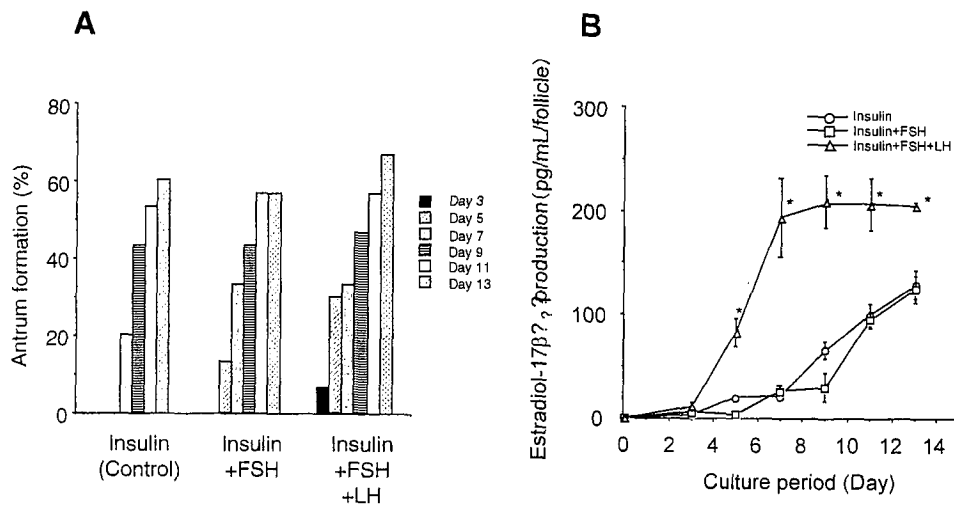


Fig. 4. Combination effects of FSH and LH with insulin on antrum formation (A) and E_2 production (B) of middle stage preantral follicles during 13 days in culture. Asterisks show significance to other values ($P < 0.05$) on the same period.

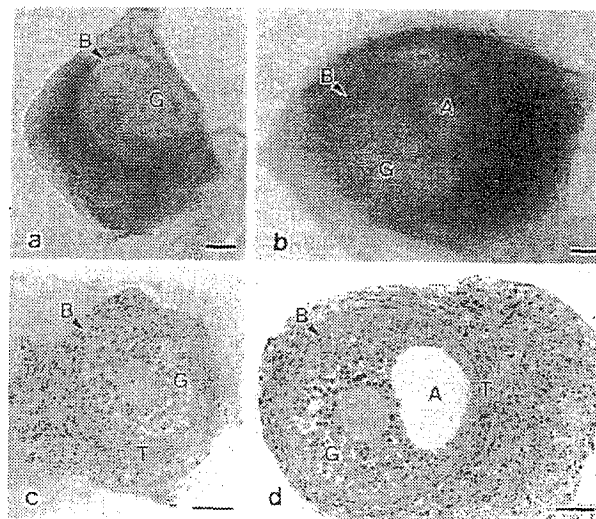


Fig. 5. Light micrographs of whole (a, b) and semithin sections (c, d) of bovine middle stage preantral follicles after isolation (a, c) and after culture (b, d). A: antrum, B: basal membrane, G: granulosa cells, T: theca cells. Scale bar = 50 μ m.

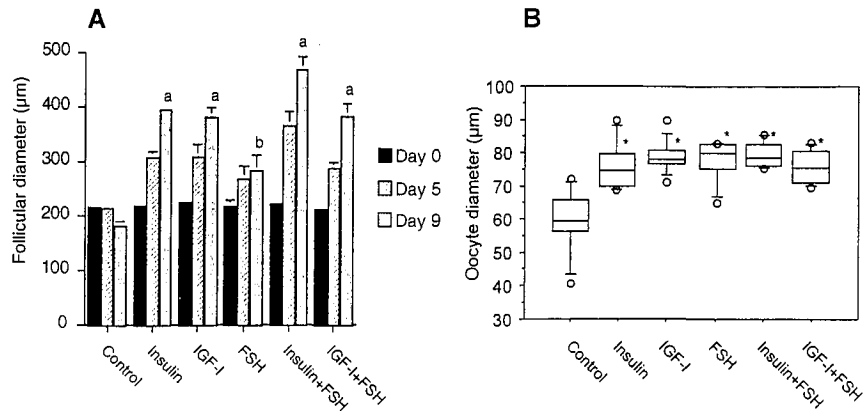


Fig. 6. Follicle growth during 9 days (A) and oocyte diameter at 9 days (B) of late stage preantral follicles in culture. a-b Significantly to the each Day 0 value (a: $P < 0.001$, b: $P < 0.05$). * Significantly to the control value ($P < 0.05$).

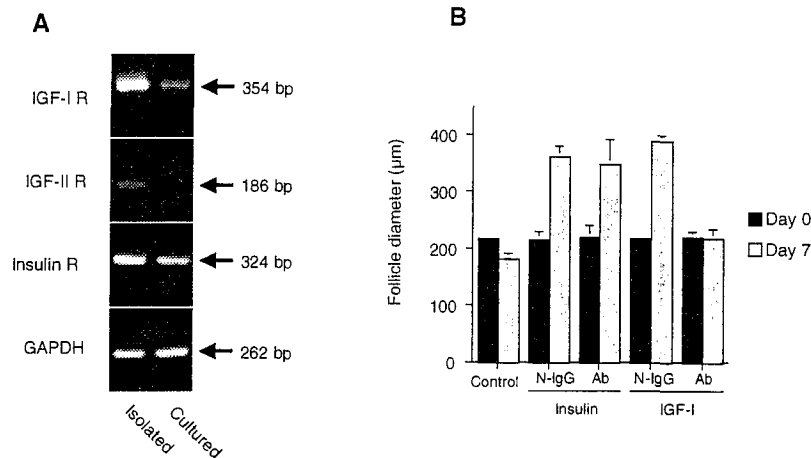


Fig. 7. Gene expression of insulin receptors in isolated and cultured late stage preantral follicles (A) and the effect of IGF-I receptor neutral antibody on the growth on the late stage preantral follicles (B). N-IgG: Normal IgG, Ab: anti-IGF-I receptor antibody.

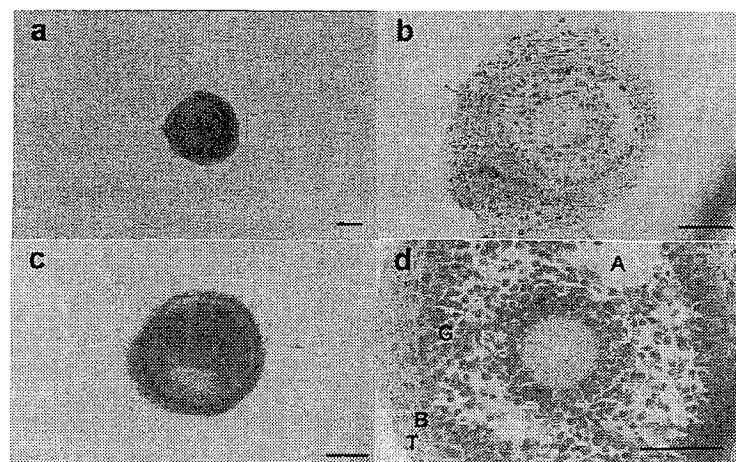


Fig. 8. Light micrographs of whole (a, c) and semithin sections (b, d) of bovine late stage preantral follicles after isolation (a, b) and after 9 days of culture (c, d). A: antrum, B: basal membrane, G: granulosa cells, T: theca cells. Bar= 100 μm.

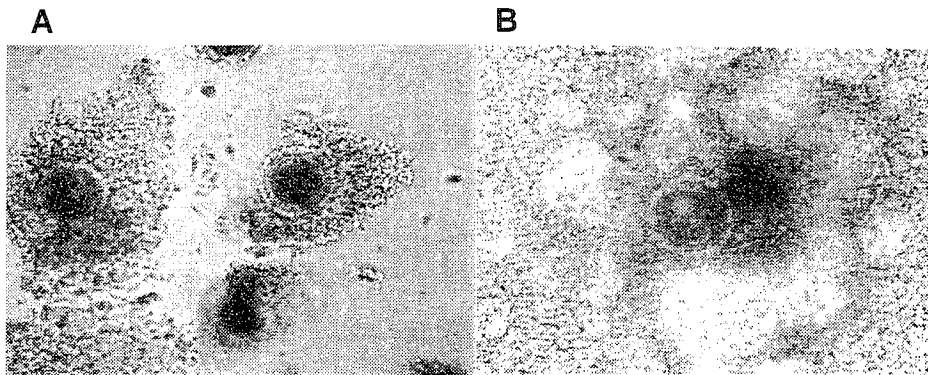


Fig. 9. Morphology of isolated (A) and 14 days cultured (B) COCGs derived from late stage preantral follicles cultured with insulin and FSH.

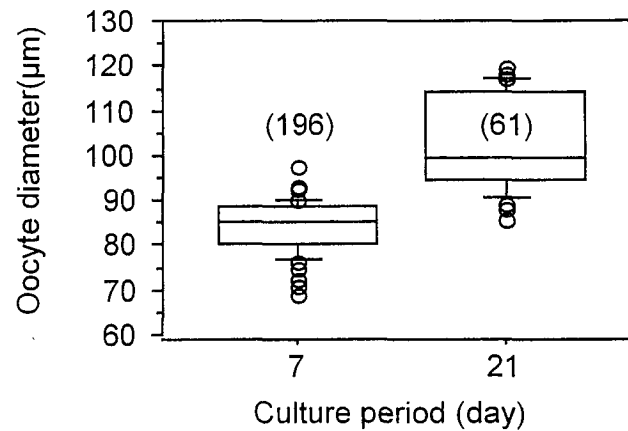


Fig. 10. Growth of oocytes in 14 days COCGs culture derived from late stage follicles cultured with insulin and FSH. Nos. in parenthesis represents the COCGs with normal morphology.

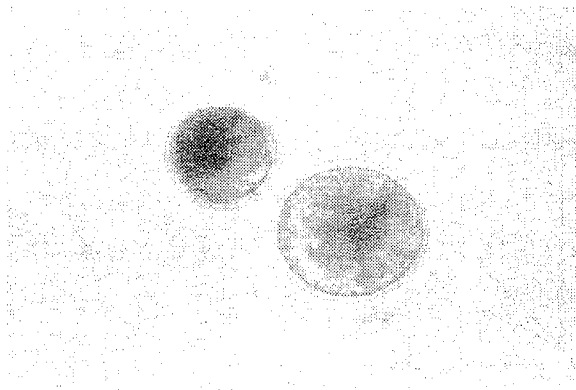


Fig. 11. Blastocyst (A) and degenerated embryo (B) derived from the in vitro growth oocytes of late stage preantral follicles.

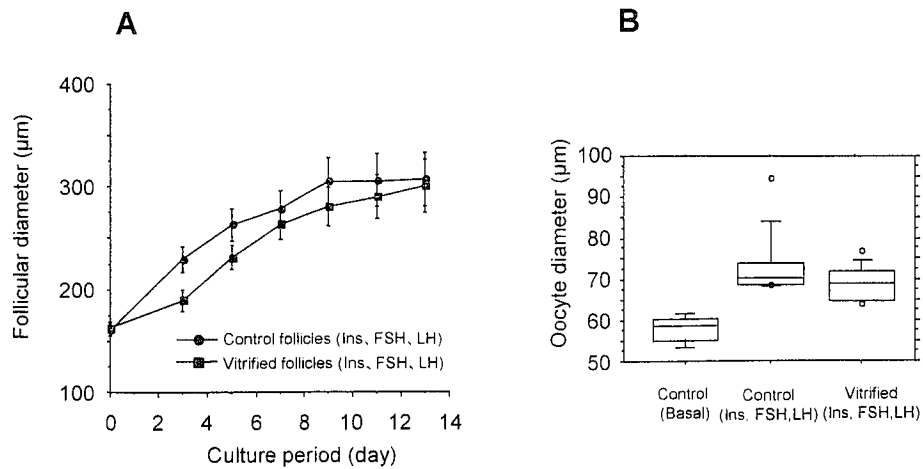


Fig. 12. Follicle growth during 13 days (A) and oocyte diameter at 13 days (B) of vitrified middle stage preantral follicles in culture.

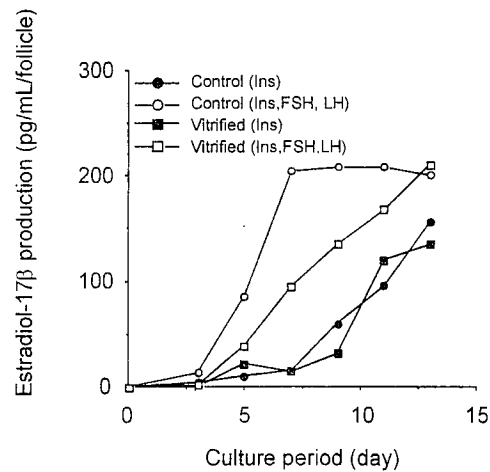


Fig. 13. Estradiol-17 β production of vitrified middle stage preantral follicles during 13 days.

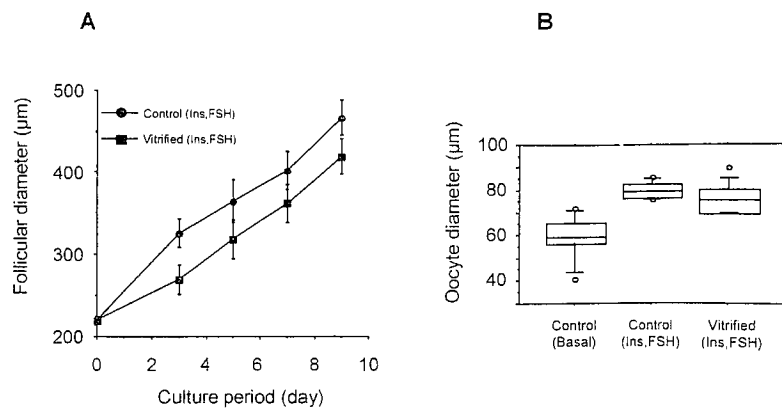


Fig. 14. Follicle growth during 13 days (A) and oocyte diameter at 13 days (B) of vitrified late stage preantral follicles in culture.

論文審査結果要旨

哺乳類の卵巢には多数の発育途上卵子が存在する。しかし、これらの大多数は発育途上で退行してしまう運命にある。もし、これらの発育途上卵子を卵巢から単離し、体外培養によって完全発育が可能となれば、家畜繁殖技術、絶滅種の保護・再生、不妊治療においても重要な技術となりうる。また、これらの発育途上卵子の凍結保存技術が確立されれば、貴重な遺伝子資源としての卵子の長期間にわたる保存や遠距離輸送などが可能となる。さらに発育途上卵子の体外培養技術と凍結保存技術を連携することにより、それぞれの技術は極めて有用性の高い技術となりうる。本研究においては、ウシの発育途上卵子の発育ステージを初期前胞状卵胞（一次卵胞～初期二次卵胞）、中期前胞状卵胞（後期二次卵胞）、後期前胞状卵胞（後期二次卵胞～初期三次卵胞）の3つに分類し、それぞれのステージにおいて発育に必要な環境及び因子の探索を行い、最良の卵胞・卵子発育培養環境を構築することを目的とした。一方、発育ステージごとに最適な凍結保存方法の開発を目指すとともに凍結保存した発育途上卵子においても体外発育培養系で正常な発育が行われることを検証した。その結果、初期前胞状卵胞を卵巢から、低侵襲で効率的に単離する方法を開発するとともに、間質系細胞に初期前胞状卵胞の生存活性を見だし、無血清培地で共培養することにより、生存性を維持しながら中期前胞状卵胞へ体外発育させることに成功した。また、この生存維持作用は、細胞との細胞外マトリックスタンパク質を介したものであることを示した。初期前胞状卵胞の凍結保存について、初期前胞状卵胞を細胞外マトリックスタンパク質であるコラーゲンゲルに包埋した状態でガラス化保存することにより、生存性の低下を抑え、高い回収率を得ることに成功した。また、本方法によりガラス化保存された卵胞は融解後においても体外培養において発育能を有することを明らかにした。中期前胞状卵胞について、卵胞の3次元構造の維持が可能な培養形態を選択し、無血清培養系を用いて卵胞・卵子の発育に影響を与える生理活性物質の探索を行った。その結果、生理的濃度のインスリンが卵胞・卵子直径増大、機能分化を促進することを明らかにした。さらに、FSH, LHはインスリンの作用を増強することも示した。一方、これらの因子の存在下で培養された卵胞は形態的に正常に後期前胞状卵胞にまで発育することも明らかにした。

後期前胞状卵胞について、生理的濃度のインスリン、FSHは後期前胞状卵胞から初期胞状卵胞への正常な発育に重要な因子であることを明らかにした。さらに、後期前胞状卵胞由来卵子の完全発育を遂行する目的で初期前胞状卵胞まで発育させた卵胞から卵子-卵丘-顆粒膜細胞複合体を摘出し、血清含有培地で発育培養を行うことにより、完全発育卵子を得た。完全発育した後期前胞状卵胞由来卵子について体外成熟培養、媒精、発生培養を行い、世界で初めて胚盤胞期胚にまで発生させることに成功した。さらに、ガラス化保存された中期及び後期前胞状卵胞は、融解後の発育培養において正常な発育能を有することを明らかにした。

本研究の結果は、ウシ発育途上卵子の凍結保存と体外発育を可能とするものであり、ウシ卵子の体外生産技術の確立に大きく貢献するものである。このことは応用動物科学、動物生殖科分野において高く評価される。よって博士（農学）の学位を授与できるものと判定した。